

〔報告〕高松塚・キトラ古墳壁画上の微生物汚れの除去 酵素の選抜とその諸性質

著者	佐藤 嘉則，木川 りか，貴田 啓子，川野 邊渉，早川 典子
雑誌名	保存科学
号	57
ページ	11-21
発行年	2018-03-23
URL	http://id.nii.ac.jp/1440/00005723/

〔報告〕 高松塚・キトラ古墳壁画上の微生物汚れの除去 —酵素の選抜とその諸性質—

佐藤 嘉則・木川 りか*・貴田 啓子・川野邊 渉・早川 典子

1. はじめに

高松塚・キトラ古墳壁画では、修理作業施設において脆弱な漆喰層の補強を目的とした剥落止めや強化処置、そして壁画が石室内で保存されていた間に出現したカビ、酵母、細菌等の菌体に由来する痕跡(以下、微生物汚れと表記する)の除去を目的としたクリーニング作業といった壁画の修復作業が進められてきた。剥落止めや強化処置には、セルロース誘導体(ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、メチルセルロース(MC))や、天然高分子材料の布海苔から不純物を除去した精製布海苔水溶液が用いられており^{1, 2)}、微生物汚れのクリーニング作業については、彩色材料の存在しない余白漆喰部分では紫外線照射や次亜塩素酸ナトリウム塗布を用いた方法^{1, 2, 3)}によって処置が行われてきた。しかし、紫外線照射や次亜塩素酸ナトリウム塗布では彩色材料に影響を与えることが懸念されるため、彩色材料の存在する箇所については別の方法による処置が必須であった。この課題に対して、酵素を利用した微生物痕の除去方法について基礎研究⁴⁾が進められている。酵素とは生物が生合成する触媒(生体触媒)であり、触媒とはその物質自体は変化しないが、その存在(触媒作用)によって、特定の化学反応の反応速度を速める物質のことである。酵素反応の特徴の一つに、ある酵素は特定の物質のみを認識して、その化学反応のみを触媒するという基質特異性が挙げられる。つまり、壁画の微生物汚れを対象とした場合、微生物汚れの元となっている菌体のみを酵素が識別し、彩色顔料や漆喰などの文化財を構成する他の物質には影響を与えることなく、効率的に微生物汚れの分解が期待できるというものである。

その一方で、文化財のクリーニングに酵素を用いる際には、修復材料への負の効果が懸念される。すなわち、酵素の基質特異性は類似する構造の物質に幅広く作用する比較的低いものから、ある物質のみにしか作用しない非常に高いものまである。そのため、基質特異性が広く、微生物汚れ以外にも構造が類似する修復材料への分解活性を示すような酵素を選択してしまうと、酵素処理した部位に修復材料を施しても、残存する酵素が修復材料に作用し、接着能力などの修復材料本来の機能を損なうことがある。また、酵素の精製が不十分な場合にも同様の問題が起こり得る。すなわち、多種の酵素が混在するような精製が不十分な酵素の場合、修復材料に作用する酵素が混在し、それが修復材料に悪影響を与えることがある。これらのことを整理すると、高松塚・キトラ古墳壁画の彩色箇所のクリーニング作業に酵素を適用しようとするときの条件として、壁画の彩色や漆喰などの基材に全く影響を与えない酵素であることに加えて、修復に用いられる材料にも影響を与えない酵素であること、さらに混在する酵素活性の無い十分に精製された酵素であることが必須条件となる。

貴田らの先行研究⁴⁾では、微生物汚れの分解酵素として、タンパク質分解酵素であるProteinase K、細菌の細胞壁溶解酵素であるLysozyme, Achromopeptidase、カビや酵母など

*九州国立博物館

の真菌細胞壁溶解酵素である Lysing enzymes, Zymolyase, Yatalase の 6 種類の酵素について試験が行われた。分子量分布の解析結果から, Achromopeptidase および Lysing Enzymes は, 修復材料である MC を低分子化させ, Lysing Enzymes, Zymolyase, Yatalase の酵素では, 精製布海苔を低分子化させることを示唆している。さらに, 炭酸カルシウムを基材とした下地を用いて, 精製布海苔の硬化に及ぼす各種酵素の影響を調べた貫入試験では, Proteinase K, Lysozyme, Achromopeptidase の場合, 貫入抵抗値が高くなり, また精製布海苔が浸透しにくくなることを報告している。酵素液による貫入抵抗値の上昇については, 精製布海苔水溶液に酵素液を滴下した際に白濁凝集が観察されているため, その結果として貫入抵抗値が上昇したのではないかと考察している⁴⁾。そしてこれらの基礎試験から, 壁画のクリーニングに用いる酵素として, その後の修復作業に精製布海苔を用いる場合は Achromopeptidase, 修復作業に MC を用いる場合は Lysozyme を選択することを推奨している^{4,5,6)}。

高松塚古墳およびキトラ古墳壁画の表面に存在する微生物汚れは, 主にカビ, 酵母, 細菌といった微生物の菌体とそれらが分泌する細胞外多糖類などによって形成された構造体 (バイオフィーム) と暗色系のカビの菌糸 [主なものに *Acremonium* sect. (*Gliomastix*) など] であることが明らかとなっている⁷⁾。これらの微生物汚れの構成要素のうち, 細菌に対しては Achromopeptidase と Lysozyme が有効であると考えられるが, カビと酵母は, 細菌とは異なる細胞壁成分を有するため, 別の酵素を探索する課題が残されている。そこで, 本研究ではカビと酵母を効率よく取り除くための真菌類細胞壁溶解酵素を探索し, 選抜した酵素と Achromopeptidase および Lysozyme について, 壁画の彩色と各種の修復材料に与える影響について詳細に検討することを目的とした。

2. 試料および実験方法

2-1. 真菌類細胞壁溶解酵素の選抜

真菌類の細胞壁は, 種によって異なるものの主として多糖類(グルカン, キチン, キトサン), タンパク質, 脂質, 無機塩類から構成されている。このなかで主要な構成成分であるグルカンとキチンを標的として酵素の探索を行った。グルカンを分解する酵素の名称はグルカナーゼ, キチンを分解する酵素の名称はキチナーゼであり, いくつかの企業から種々の製品が販売されている。本研究では株式会社耐熱性酵素研究所の β -1, 3-グルカナーゼ B (EC No. 3.2.1.39) とキチナーゼ (EC No. 3.2.1.14) を選抜した。 β -1, 3-グルカナーゼ B (TGL-75-01, 耐熱性酵素研究所) は好熱細菌, キチナーゼ (CTN-50-01, 耐熱性酵素研究所) は古細菌に由来する酵素⁸⁾で, それぞれの酵素を生合成するための遺伝子を用いて大腸菌を形質転換し, 組換えタンパク質として発現させたものである。両酵素を選抜した理由として, 次の 2 点が挙げられる。①両酵素は高温耐性があり, 精製の過程で大腸菌由来の混在する酵素を熱処理によって失活させることが出来るため, 非常に純度が高い。②耐熱性酵素であるため熱に安定しており, 酸やアルカリ, または有機溶媒等に対しても耐性が見込める[温度や pH 安定性等の諸性質は耐熱性酵素研究所 (<http://www.tainetsu.com/>) 公開のデータシートを参照] ため, 修理現場での取り扱いが容易である。

さらに, 修復現場での処置を容易にするため, β -1, 3-グルカナーゼ B とキチナーゼを混合した酵素液を調整し, 両者の活性が阻害されないことを確認した上で, 文化財専用の製品(酵素名: Enzyme Mixture CTB-1; 製品コード: EMCTB-01; 耐熱性酵素研究所)として開発した。以降, 本稿では β -1, 3-グルカナーゼ B とキチナーゼの混合酵素液を EMCTB-01 と表記する。

2-2. 彩色材料への影響

実際の修復作業を想定して、3種類の酵素 [Achropeptidase (014-09661, 和光純薬), Lysozyme (L6876, Sigma-Aldrich), Enzyme Mixture CTB-1 (EMCTB-01, 耐熱性酵素研究所)] が色材へ与える影響を確認した。使用した材料と方法は次の通りである：胡粉 (上羽絵惣株式会社), 白土 (中川胡粉絵具株式会社), 黄土, 鶏冠朱 (以上, 株式会社放光堂), 緑土 (株式会社喜屋), プルシアンブルー (ホルベイン工業株式会社), 鉛白, 鉛丹, 緑青 (9番), 白緑青, 群青 (9番), 白群青, 辰砂 (12番), 辰砂白, ベンガラ, 岱緒, 油煙, 松煙, 金箔, 銀箔 (以上, 有限会社金開堂)。このうち, 鶏冠朱, プルシアンブルーは合成された材料であり, また石黄と緑土は高松塚古墳, キトラ古墳の両壁画では確認されていないが, 今後の他の作品への使用を念頭に試料に加えた。

上記20種類の顔料に各酵素液を滴下し, 変化を測定した。試料は以下のようにして調製した。水に分散させた顔料をガラスプレート上に滴下し, 十分に風乾させたのちに EMCTB-01, Achropeptidase および Lysozyme 酵素を滴下したものを測定試料とし, 水のみを滴下したものを対照試料とした。測定は滴下後, 十分に試料が乾燥した後に行った。測定は, 各試料にカバーガラスを被せ, その上から分光測色計 (CM-2600d, コニカミノルタセンシング) を用いて行った。それぞれの試料につき $L^*a^*b^*$ 値を3回測定し, その平均値を算出した。対照試料との色差 ΔE を $[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ として算出した。

2-3. 修復材料への影響

高松塚古墳およびキトラ古墳壁画の修復に用いられる主な材料としては, HPC, MC およびフノラン (精製布海苔) である。今後の汎用性も踏まえ, これらの基質に加えて, CMC (カルボキシメチルセルロース), 濾紙, デンプン, キシラン, カゼイン, パルミチン酸の合計9種類の基質を選抜し, 試験に供試した (表1)。なお, 精製布海苔については, 参考文献⁹⁾に従い調整した。それぞれの基質に対して, 3種類の酵素 [Achropeptidase (014-09661, 和光純薬), Lysozyme (L6876, Sigma-Aldrich), Enzyme Mixture CTB-1 (EMCTB-01, 耐熱性酵素研

表1 試験に用いた基質

基質名	製品名	販売元	関連する修復材料あるいは文化財構成材料
CMC (カルボキシメチルセルロース)	CMC sodium salt	Sigma-Aldrich	CMC (強化剤・接着剤)
MC (メチルセルロース)	Methyl cellulose: viscosity 4,000cP	Sigma-Aldrich	MC (強化剤・接着剤)
HPC (ヒドロキシプロピルセルロース)	Hydroxypropyl cellulose	日本曹達	HPC (強化剤・接着剤)
濾紙	定量濾紙 No.5A	Advantec	紙, 藁, 木材など
フノラン	精製布海苔	東京文化財研究所製*	布海苔 (強化剤・接着剤)
デンプン	可溶性でんぷん	ナカライテスク	デンプン糊 (強化剤・接着剤)
キシラン	Xylan from beechwood	Sigma-Aldrich	紙, 藁, 木材など
カゼイン	Casein from milk	ナカライテスク	絹, 皮革, 毛, 膠など
パルミチン酸	p-Nitrophenyl palmitate	Sigma-Aldrich	油絵具など

*精製布海苔の調整方法は参考文献⁹⁾に記載

究所〕が与える影響について、基質が分解を受けた際に生成する物質質量（還元末端量）を定量することで評価した。具体的な試験方法は次項に記述する。

2-3-1. CMC, MC, HPC を基質とした分解活性の測定

CMC, MC, HPC を基質とした反応では、各酵素によって生成する還元末端量を Somogyi-Nelson 法¹⁰⁾によって定量した。具体的には、まず基質として CMC, MC および HPC をそれぞれ加温した蒸留水に溶解し、1% (w/v) の基質水溶液を調整した。各基質水溶液50 μ L と各酵素液 (0.2% (w/v) Achropeptidase 水溶液, 4% (w/v) Lysozyme 水溶液, EMCTB-01 液 (酵素原液5 μ L, 1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 5 μ L, 蒸留水40 μ L) 50 μ L を混合して全量を100 μ L とし反応を行った。反応は、酵素ごとの至適温度となるように、Achropeptidase は37 $^{\circ}$ C で18時間, Lysozyme は25 $^{\circ}$ C で18時間, EMCTB-01 は85 $^{\circ}$ C で30分間の条件で行った。ただし、MC および HPC を基質とした際、EMCTB-01の至適温度である85 $^{\circ}$ C では反応液中に沈殿が多量に生成し測定に適さないと判断されたため、反応条件を37 $^{\circ}$ C で18時間とした。また、全ての測定で、酵素液の代わりに50 μ L の蒸留水を加えた系を酵素ブランクとし、基質溶液の代わりに50 μ L の蒸留水を加えた系を基質ブランクとして調整し、同様の条件で反応を行った。反応後の溶液に0.2mL のソモギ-銅液 (277-23291, 和光純薬) を添加し、沸騰浴中で10分間加熱し、水冷後0.2mL のネルソン液 (273-08295, 和光純薬) を添加し、遠心分離 (20,000 \times g, 10分間) した上清の500nm における吸光度を測定した。この吸光度値を、0 から0.1mg/mL のグルコース標準溶液を用いて同様の操作から得られた吸光度を基に作成した検量線にプロットして還元末端量を求めた。なお、全ての反応系は2連で行い、平均値を測定値とした。

2-3-2. 濾紙, フノラン, デンブ, キシランを基質とした分解活性の測定

濾紙, フノラン, デンブ, キシランを基質とした反応では、酵素反応によって生成する還元末端量をジニトロサリチル酸法 (DNS 法)¹¹⁾によって定量した。濾紙の分解活性は、あらかじめ約1mm 角になるように細断した濾紙5mg を蒸留水50 μ L に加え基質液とした。フノランおよびデンブは加熱した蒸留水に溶解させ、それぞれ1% (w/v) フノラン水溶液と0.5% (w/v) デンブ水溶液を調整した。キシランは、5mg を秤取して50 μ L の蒸留水に加え基質液とした。各基質水溶液50 μ L と各酵素液 (0.2% (w/v) Achropeptidase 水溶液, 4% (w/v) Lysozyme 水溶液, EMCTB-01液 (酵素原液5 μ L, 1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 5 μ L, 蒸留水40 μ L) 50 μ L を混合して全量を100 μ L とし反応を行った。反応は、酵素ごとの至適温度となるように、Achropeptidase は37 $^{\circ}$ C で18時間, Lysozyme は25 $^{\circ}$ C で18時間, EMCTB-01 は85 $^{\circ}$ C で30分間の条件で行った。また、全ての測定で、酵素液の代わりに50 μ L の蒸留水を加えた系を酵素ブランクとし、基質溶液の代わりに50 μ L の蒸留水を加えた系を基質ブランクとして調整し、同様の条件で反応を行った。反応後の溶液に、DNS 試薬¹¹⁾を300 μ L 添加して反応を停止させた後、沸騰浴中で5分間加熱し、遠心分離 (20,000 \times g, 10分間) した上清の500nm における吸光度を測定した。濾紙およびデンブを基質とした際は、0 から0.1mg/mL のグルコース標準溶液を用い、フノランを基質とした際は、グルコースに代えてガラクトース標準溶液を用い、キシランを基質とした際は、キシロース標準液を用いて、それぞれ同様の操作から得られた吸光度を基に作成した検量線にプロットして還元末端量を求めた。なお、全ての反応系は2連で行い、平均値を測定値とした。

2-3-3. カゼインを基質とした分解活性の測定

カゼインを基質とした反応では、酵素反応によって遊離する酸可溶性ペプチドを定量する方法（全プロテアーゼ活性測定法）によって分解活性を確認した。Achromopeptidase および Lysozyme の際は、1.2g のカゼインを約80mL の0.02M 水酸化ナトリウム溶液に懸濁し、沸騰浴中で溶解した後冷却し、塩酸で pH7.0 に調整後、蒸留水で100mL に定容し、1.2% (w/v) カゼイン溶液とした。これを0.3mL とり、0.3mL の各酵素液[0.04% (w/v) Achromopeptidase 水溶液、4% (w/v) Lysozyme 水溶液] を混合し、Achromopeptidase は37°C で5分間、Lysozyme は25°C で18時間の条件で反応を行った。EMCTB-01は同様に調整した0.6% (w/v) カゼイン溶液で行い、0.5mL のカゼイン溶液に EMCTB-01原液を0.1mL 加え、85°C で30分間の条件で反応を行った。反応後に0.5mL の TCA 溶液 (0.1M トリクロロ酢酸、0.22M 酢酸ナトリウム、0.33M 酢酸) を加えて混合し、30°C で30分間静置した。これを遠心分離 (20,000×g, 10分間) した上清0.2mL に0.9mL の0.4M 炭酸ナトリウムを混合し、さらに phenol 試薬 (Folin-Ciocalteu's reagent solution, ナカライテスク) を蒸留水で3倍希釈した溶液を0.1mL 混合した。そして30°C で30分間静置後に遠心分離 (20,000×g, 10分間) した上清の660nm における吸光度を測定した。また、0.5mL の TCA 溶液に各酵素液を0.1mL 加え、それぞれの酵素の反応条件で処理した後、0.5mL のカゼイン溶液を加え30°C で30分間静置したものを遠心分離 (20,000×g, 10分間) し、ブランクとした。0 から50μg/mL のチロシン標準溶液を用いて、同様の操作によって得られた測定値から作成した検量線に、各酵素反応によって得られた吸光度を当てはめて、遊離した酸可溶性ペプチド中のチロシン量を算出した。なお、全ての反応系は2連で行い、平均値を測定値とした。

2-3-4. パルミチン酸を基質とした分解活性の測定

p-nitrophenol (pNP) を結合させたパルミチン酸 (pNP-palmitate) を基質とし分解に伴って遊離する pNP を比色する方法で活性の測定を行った。Achromopeptidase および Lysozyme の際は、1g のパルミチン酸を5mM となるようジメチルスルホキシドに溶解し、この溶液を蒸留水で25倍に希釈して、0.2mM パルミチン酸溶液を調整し基質溶液とした。基質溶液0.1mL に等量の各酵素液を添加し、Achromopeptidase は37°C で18時間、Lysozyme は25°C で18時間の条件で反応を行った。EMCTB-01の際は、1g のパルミチン酸を5mM となるようジメチルスルホキシドに溶解し、この溶液を0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で50倍に希釈して、0.1mM パルミチン酸溶液を調整し基質溶液とした。基質溶液0.2mL に10μL の EMCTB-01原液を添加し、85°C で30分間の条件で反応を行った。反応後に0.4mL の0.25M 炭酸ナトリウム溶液を添加し、遊離 pNP に由来する420nm における吸光度を測定した。また、酵素液の代わりに同量の蒸留水を加え反応を行った系を酵素ブランク、基質溶液の代わりに同量の蒸留水を加え反応を行った系を基質ブランクとした。なお、全ての反応系は2連で行い、平均値を測定値とした。

3. 結果および考察

3-1. 彩色材料への影響

結果を図1に示す。どの酵素においても似たような変色傾向が確認された。一般的に色差2.5以内が許容色差の3級にあたる。この許容差は JIS Z8721で標準色票に定められた色差範囲であり、「離間して判定した場合に、ほぼ同一と認めることができる」とされている。また、色差5.0以内は「経時比較した場合に、ほぼ同一と認めることができる」とされ、許容色差の4級に

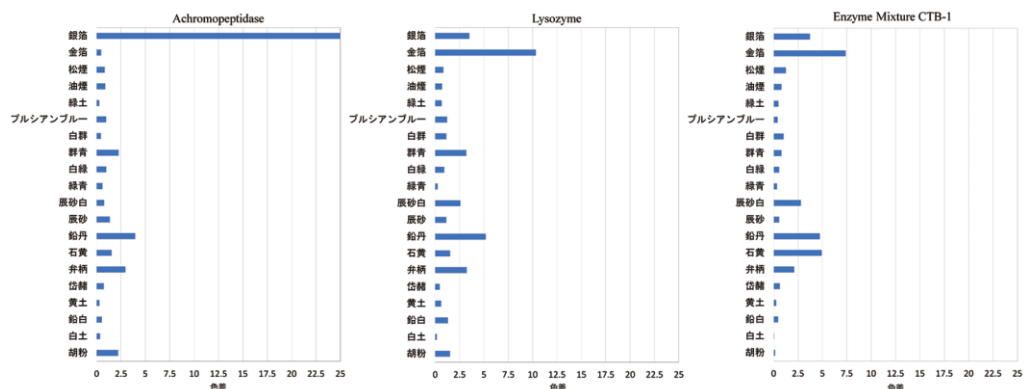


図1 各顔料における Achropeptidase (左), Lysozyme (中央), Enzyme Mixture CTB-1 (右) 滴下前後の色差 (ΔE)

あたる¹²⁾。

これらを踏まえて得られた結果を考察すると、色差が5.0以上となった試料は、Achromopeptidase 滴下の金箔と Lysozyme, EMCTB-01滴下の銀箔を除いたすべての金箔試料, 銀箔試料であった。色差の大きい金属箔試料においては、酵素液の滴下時に箔の表面から浸透せずに留まり乾燥固化したため、酵素の溶質成分が乾燥後に箔の上に白く残る状態が観察された。色差が著しく大きい値となったのはその状況を反映したためと考えられる。例えば、最も色差の大きかった銀箔の上にアクロモペプチダーゼを滴下した試料において滴下前ととの色差は、 $\Delta L^*=29.98$, $\Delta a^*=0.79$, $\Delta b^*=-3.04$ であり、水だけを滴下した場合の色差 $\Delta L^*=5.77$, $\Delta a^*=0.96$, $\Delta b^*=2.54$ と比較すると ΔL^* のみが突出して変化していることが明らかである。実際の作業においては、箔の上に酵素液を使用する場合は、乾燥固化する前に吸い取る作業によってより多くを除去してしまうため、乾燥固化した溶質成分による色味の変化は抑制できると考えられる。

また、群青、辰砂白、鉛丹、石黄、弁柄はいずれかの酵素液において色差が2.5を越えるものがあり、やや色差が大きい傾向が見られた。それ以外の顔料では色差は2.5以内に収まっている。実際の絵画の修復においては、多くの場合、クリーニングの後に修復材料（剝落どめ材料）を

表2 CMC、MC、HPC を基質とした測定での還元末端量

反応液	還元末端量 (μmol/mL)		
	Achropeptidase	Lysozyme	Enzyme Mixture CTB-1
CMC			
酵素添加	0.37	0.35	0.03
基質ブランク	0.31	0.35	0.03
酵素ブランク	0.04	0.03	0.02
MC			
酵素添加	0.31	0.42	0.03
基質ブランク	0.31	0.40	0.02
酵素ブランク	0.03	0.03	0.03
HPC			
酵素添加	0.31	0.42	0.03
基質ブランク	0.31	0.40	0.03
酵素ブランク	0.03	0.03	0.03

施すが、これらを用いた場合に明度差が2.5を超える（色差も2.5を超える）場合も確認されており¹³⁾、酵素処理においては使用後に拭き取り除去されることを考え合わせると、色みの変化は適用可能な範疇であると考えられる。

3-2. 修復材料への影響

CMC, MC, HPC を基質とした分解活性の測定結果を表2に示す。CMC を基質とした試験では、Achromopeptidase, Lysozyme, EMCTB-01のいずれも酵素添加の還元末端量は酵素ブランクの還元末端量より増加が認められたが、この値は基質ブランクの還元末端量とほぼ同程度であったことから、この増加は酵素溶液中の微量の還元性物質の影響であると考えられた。すなわち、3種類の酵素はいずれも CMC を基質とは認識せず、分解活性は認められないと考えられる。また、MC および HPC も CMC と同様に、3種類の酵素のいずれも酵素添加の還元末端量は酵素ブランクの還元末端量より増加が認められたが、この値は基質ブランクの還元末端量とほぼ同程度であったことから、この増加は酵素溶液中の微量の還元性物質の影響であると考えられ、3種類の酵素はいずれも MC および HPC も基質とは認識せず、分解活性はほとんど認められないと考えられる。

濾紙、フノラン、デンプン、キシランを基質とした分解活性の測定結果については表3に示す。まず、濾紙を基質とした際の Achromopeptidase および Lysozyme の活性では、酵素液の添加によって酵素添加の還元末端量が酵素ブランクの還元末端量より増加したが、基質ブランクと酵素ブランクの還元末端量の和と同程度であった。このことから、濾紙の酵素分解に伴う還元末端量の増加ではないと考えられ、両酵素は濾紙を基質として分解しないと考えられた。EMCTB-01では酵素添加の還元末端量は酵素ブランクの還元末端量と同程度であったため、濾紙を基質とした分解活性は認められないと判断した。次に、フノランを基質とした際には、Lysozyme で酵素添加の還元末端量は酵素ブランクの還元末端量より増加が認められたものの、基質ブランクの還元末端量と同程度であったため、分解活性はないと判断された。

表3 濾紙、フノラン、デンプン、キシランを基質とした測定での還元末端量

反応液	還元末端量 ($\mu\text{mol/mL}$)		
	Achromopeptidase	Lysozyme	Enzyme Mixture CTB-1
濾紙			
酵素添加	5.00	5.00	1.12
基質ブランク	4.04	4.04	N.T.*
酵素ブランク	1.15	1.15	1.12
フノラン			
酵素添加	0.27	2.88	0.02
基質ブランク	0.19	2.93	N.T.
酵素ブランク	0.25	0.28	0.01
デンプン			
酵素添加	2.29	6.91	2.48
基質ブランク	0.19	4.64	N.T.
酵素ブランク	2.25	2.26	2.50
キシラン			
酵素添加	6.26	9.46	3.76
基質ブランク	6.35	4.04	N.T.
酵素ブランク	0.10	6.65	3.81

*N.T., not tested

表4 カゼインを基質とした測定での酸可溶性ペプチド中のチロシン量

反応液	チロシン相当量 ($\mu\text{mol/mL}$)		
	Achropeptidase	Lysozyme	Enzyme Mixture CTB-1
酵素添加	37.1	20.7	58.0
ブランク	9.6	21.0	53.0

表5 パルミチン酸を基質とした測定での吸光度 ($A_{420\text{ nm}}$) の比較

反応液	吸光度 ($\mu\text{mol/mL}$)		
	Achropeptidase	Lysozyme	Enzyme Mixture CTB-1
酵素添加	0.08	0.08	>0.01
基質ブランク	>0.01	>0.01	N.T.*
酵素ブランク	0.08	0.08	>0.01

*N.T., not tested

Achropeptidase および EMCTB-01では酵素添加の還元末端量は酵素ブランクの還元末端量と同程度であったため、分解活性は認められないと考えられる。デンプンおよびキシランを基質とした際は、いずれの酵素でも酵素添加の還元末端量は、基質ブランクまたは酵素ブランクの還元末端量と同程度か、あるいは基質ブランクと酵素ブランクの還元末端量の和と同程度であったため、分解活性はないと判断された。

カゼインを基質とした分解活性の測定は表4に示す。Lysozyme と EMCTB-01ではブランクと同程度のチロシン量の増加であったため、カゼインの分解活性はないと判断された。一方、Achropeptidase からは非常に高い分解活性が認められた。Achropeptidase は Lysyl endopeptidase に分類されるタンパク質分解酵素であるため、タンパク質成分であるカゼインの分解活性を示した。Achropeptidase については、膠などのタンパク質を主成分とする修復材料を用いる場合での使用は不適切である。

パルミチン酸を基質とした分解活性の測定では、パルミチン酸の分解に伴って遊離する pNP に由来する420nmにおける吸光度を測定したが、いずれの酵素でも有意な吸光度の増加は認められなかったことから、パルミチン酸の分解活性はないと考えられる。

4. まとめ

本研究では、高松塚古墳およびキトラ古墳壁画の表面に形成されたカビ、酵母、細菌といった微生物の菌体とそれらが分泌する細胞外多糖類などによってできたバイオフィルムを除去するために、真菌類細胞壁溶解酵素の探索と選抜した酵素が壁画の彩色や漆喰などの基材と各種の修復材料に与える影響について検討を行った。真菌類細胞壁溶解酵素の探索では、株式会社耐熱性酵素研究所の β -1,3-グルカナーゼBとキチナーゼを選抜し、修復現場での処置を容易にするために両酵素を混合した文化財用の酵素液として開発した。そして、その酵素 (EMCTB-01) と先行研究で選抜した2酵素 (Achropeptidase, Lysozyme) が壁画の彩色に与える影響を評価した。その結果、金箔試料、銀箔試料のような金属箔試料においては、色差が大きくなる結果となったが、酵素液が金属箔の表面で乾燥固化し酵素の溶質成分が析出したためと考えられ、実際のクリーニング作業では、乾燥固化前に吸い取るため色味の変化はほとんど起こらないと考えられる。

次に、修復材料へ与える影響を評価するために HPC, MC, CMC, 濾紙, デンプン, フノラ

ン、キシラン、カゼイン、パルミチン酸の合計9種類の基質を用いて分解活性の有無を確認した。その結果、Achromopeptidaseは酵素の種類から予想される通りにカゼインの分解活性を示したが、カゼイン以外の供試した修復材料には分解活性を示さなかった。Achromopeptidaseについては、膠などのタンパク質を主成分とする修復材料を用いる場合には使用は不適切である。EMCTB-01とLysozymeは供試したいずれの修復材料にも分解活性を示さなかったため、紙質、木質、油質を構成材料とする文化財や修復材料として膠、布海苔、デンプン糊が用いられる場合においても使用が可能であると考えられる。

以上のことから、高松塚古墳およびキトラ古墳壁画の表面に存在する微生物汚れについて本稿で検討した酵素はクリーニング作業に適応可能であると考えられる。現在では、高松塚・キトラ古墳の両壁画で実際のクリーニング作業に用いられ、良好な結果が得られている^{14,15,16)}。本稿では古墳壁画の微生物汚れの除去を想定した酵素の開発と諸性質について研究を行ったが、本研究で選抜した酵素は材質が異なる幅広い文化財のカビのクリーニング作業においても適応可能であると考えられるため、材質の異なる文化財への適応に向けた展開が期待できる。

謝辞

本研究は文化庁からの受託調査研究課題「国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策に関する調査業務」および「特別史跡キトラ古墳保存対策等調査業務」の一環として、文化庁文化財部古墳壁画室の建石徹氏、宇田川滋正氏の多大なるご協力、ご助言のもと実施しました。また、本研究の一部は科研費「課題番号26282071（研究代表者：早川典子）」の助成を受けたものです。本研究を遂行するに当たり、耐熱性酵素研究所の奥崇氏、四方孔氏には、酵素の活性測定に関する試験の実施と試験設計および論文内容に関するご助言等を戴きました。また、東京文化財研究所客員研究員の大場詩野子氏には彩色材料への影響試験をご担当いただきました。以上、ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 川野邊渉、坪倉早智子、早川典子、小笠原具子、建石徹：国宝高松塚古墳壁画の修理について、文化財保存修復学会第31回大会研究発表講演要旨集、72-73（2009）
- 2) 坪倉早智子、川野邊渉、早川典子、小笠原具子、建石徹：国宝高松塚古墳壁画のクリーニングについて、文化財保存修復学会第31回大会研究発表講演要旨集、144-145（2009）
- 3) 独立行政法人国立文化財機構 東京文化財研究所：国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策に関する調査等業務報告書 平成23年度（2012）
- 4) 貴田啓子、早川典子、佐藤嘉則、大河原典子、和田朋子、五十嵐圭日子、木川りか、川野邊渉：壁画修復に用いる接着材料の分子量および強度の変化に及ぼす酵素の影響、保存科学、51、11-26（2013）
- 5) 文化庁：古墳壁画の保存活用に関する検討会（第10回）、資料10-2（2012）
- 6) 文化庁：古墳壁画の保存活用に関する検討会（第11回）、資料6（2013）
- 7) Sugiyama, J., Kiyuna, T., Nishijima, M., An, K.D., Nagatsuka, Y., Tazato, N., Handa, Y., Tomita, J. H., Sato, Y., Kigawa, R. and Sano, C.: Polyphasic insights into the microbiomes of the Takamatsuzuka Tumulus and Kitara Tumulus, The Journal of General and Applied Microbiology, 63, 63-113（2017）
- 8) Oku, T. and Ishikawa, K.: Analysis of the Hyperthermophilic Chitinase from *Pyrococcus*

furiosus: Activity toward Crystalline Chitin, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70, 1696-1701 (2006)

- 9) 独立行政法人国立文化財機構、川野邊渉、早川典子、坪倉早智子：フノリ抽出物の精製方法、特開2012-12541 (2012-01-19)
- 10) Hiromi, K., Takasaki, Y. and Ono S.: Kinetics of Hydrolytic Reaction Catalyzed by Crystalline Bacterial α -Amylase. III. The Influence of Temperature, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 36(5), 563-569 (1963)
- 11) Kongruang, S., Han, M.J., Breton, C.I.G. and Penner, M.H.: Quantitative analysis of cellulose-reducing ends, Applied Biochemistry and Biotechnology, 113(1), 213-231 (2004)
- 12) 日本色彩学会、新編 色彩科学ハンドブック【第2版】「第7章色差」、東京大学出版会、259-303 (1998)
- 13) 早川典子、中右恵理子、木川理科、沖本明子、川野辺渉「絵画表面に用いる修復材料の基礎的研究 ―壁画修復を中心に―」文化財保存修復学会誌53、pp.1-19 (2008)
- 14) 文化庁：古墳壁画の保存活用に関する検討会（第18回）、資料2-2 (2015)
- 15) 文化庁：古墳壁画の保存活用に関する検討会（第19回）、資料4-2 (2016)
- 16) 文化庁：古墳壁画の保存活用に関する検討会（第20回）、資料2 (2016)

キーワード：高松塚古墳壁画 (Mural painting of the Takamatsuzuka Tumulus)；キトラ古墳壁画 (Mural painting of the Kitora Tumulus)；修復 (restoration)；バイオフィilm除去法 (Biofilm removal method)；細胞壁溶解酵素 (cell wall lytic enzyme)

Selection and Characterization of Enzymes for Removal of Microbial Contamination on the Mural Paintings of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli

Yoshinori SATO, Rika KIGAWA*, Keiko KIDA,
Wataru KAWANOBE and Noriko HAYAKAWA

On the surface of the mural paintings of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli, there exist undesirable biofilms made of microbial cells of fungi, yeast, bacteria and their extracellular substances. To remove the biofilms, cell lytic enzymes were selected and examined for the effects on various restorative materials and mineral pigments that are identical with the mural paintings of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli. Among the commercially produced enzymes, Achromopeptidase, Lysozyme, β -1,3-glucanase and chitinase were selected. To evaluate the effects of these enzymes on the restorative materials, degradation activity was examined using nine substrates: hydroxypropyl cellulose, methyl cellulose, purified *funori*, carboxymethyl cellulose, filter paper, starch, xylan, casein and palmitic acid. As a result, Achromopeptidase showed no degradation activity to tested restorative materials other than casein. Thus, the use of Achromopeptidase is inappropriate when using restorative materials based on proteins such as glue. Lysozyme, β -1,3-glucanase and chitinase showed no degradation activity to any of the restorative materials. Regarding the influence on mineral pigments, color difference became large in the gold foil and silver foil samples in all cases. It is considered that this is because the enzyme solution dried and solidified on the surface of the metal foil, and the solute component of the enzyme precipitated. Therefore, in actual cleaning work, it is considered that change in color hardly occurs because enzyme solution is suctioned before drying.

The results suggest that the enzymes tested in this study can be applied for removing microbial contamination on the mural paintings of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli.

*Kyushu National Museum